

О ГЕНЕТИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ ПРЕСНОВОДНОГО МОЛЛЮСКА UNIO TUMIDUS PHIL. (BIVALVIA, UNIONIDAE)

Методом электрофорезу в поліакриламідному гелі досліджено розподіл частот аллелів поліморфних локусів алкогольдегідрогенази та глюкозидегідрогенази в 21 вибірці U. tumidus з районів Литви, України, Росії. Показана часова та просторова генетична мінливість цього виду.

Двустворчатый моллюск *Unio tumidus* Phil. образует крупные скопления как в реках, так и в непроточных пресноводных водоемах Европы. Этот вид входит в состав различных биоценозов в качестве активного филтратора. К настоящему времени нет данных о генетическом разнообразии и степени генетической изоляции локальных скоплений моллюсков и, соответственно, нет представлений о популяционной структуре данного вида в восточноевропейской части его ареала. Между тем выявление схемы популяционной структуры играет важную роль в решении задач сохранения биоразнообразия и охраны окружающей среды.

Материалом для данной работы послужили выборки *Unio tumidus* из удаленных участков ареала: р. Стрева (Литва, бассейн Немана), р. Днепр, р. Уж (Украина, бассейн Днепра), р. Москва, р. Рожая, р. Лопасня, р. Ока, р. Ахтуба и оз. Рытое (Россия, бассейн Волги).

Для исследования генетического разнообразия нами был проведен электрофорез водорастворимых ферментов жабр – алкогольдегидрогеназы (ADH) и глюкозодегидрогеназы (GDH). При анализе электрофореграмм был обнаружен полиморфизм в спектрах исследуемых ферментов. Статистическая обработка результатов позволила трактовать полученный полиморфизм ADH и GDH как генетически детерминированные двухаллельные системы, каждая из которых кодируется отдельным локусом *Adh* и *Gdh* соответственно.

Для определения возможности использования частот аллелей данных систем в качестве биохимико-генетических маркеров было проведено исследование временной изменчивости частот аллелей обоих локусов. Рядом авторов показано, что частоты аллелей какого-либо локуса в популяции могут быть как неизменными [1,2], так и претерпевать сезонные и возрастные изменения [3,4]. При этом временные изменения частот аллелей могут быть значительны, что приводит к ошибкам в оценке пространственного генетического разнообразия.

Таблица 1.

Распределение частоты аллеля А локуса Gdh в выборках из р. Рожая

№ выб.	время сбора	N	частота аллеля
1	9 мая	45	0.100
2	15 мая	100	0.505*
3	19 мая	45	0.644*
4	8 июня	26	0.654
5	1 июля	37	0.581
6	18 июля	45	0.622
7	21 июля	77	0.825
8	5 августа	45	0.289*
9	13 августа	92	0.233*
10	18 сентября	61	0.238
11	25 сентября	46	0.196
12	18 октября	91	0.066

*- распределение генотипов в выборке не соответствует закону Харди – Вайнберга.

Для исследования временной изменчивости нами было проведено сравнение выборок *U. tumidus*, полученных в разное время из реки Рожая по частотам аллелей исследованных локусов. Все выборки были взяты с одного участка реки радиусом 3-5 метров. Как показал анализ полученного материала, локус *Adh* был мономорфен во всех выборках и фиксирован по аллелю В. Частота аллеля А соответственно во всех выборках была равна 0. Распределение частоты встречаемости аллеля А локуса *Gdh* приведено в табл.1 и на рис.1. Частоты аллелей в представленных выборках изменялись за исследованный период от 0.066 до 0.825. В некоторых случаях обнаружено достоверное несоответствие наблюдаемого в выборке распределения фенотипов ожидаемому по формуле Харди – Вайнберга, сопровождающееся дефицитом гетерозигот. На рис. 1 хорошо видно, что что по частоте аллеля выборки можно разбить на две группы: выборки с частотой аллеля от 0.505 до 0.825 и выборки с частотой аллеля от 0.066 до 0.289. Все выборки первой группы достоверно отличаются по частоте аллеля от выборок второй группы, и доверительные интервалы групп не перекрываются. К первой группе относятся выборки со 2 по 7, взятые с конца мая по июль включительно. Ко второй группе относятся выборки № 1 и с 8 по

12, полученные в начале мая и августе – октябре. Таким образом, мы наблюдаем в течение года следующие изменения частоты встречаемости аллеля *A* локуса *Gdh*: с мая по июнь происходит повышение частоты примерно от 0.1 до 0.8, а с августа по октябрь идет понижение частоты с 0.8 до 0.1. Изменение частоты аллеля происходит в короткие периоды в середине мая и середине августа, причем период смены частот сопровождается нарушением равновесного распределения фенотипов в выборке (табл. 1). Кратковременная смена частот перемежается относительно длительными периодами их стабильности. Летом такой период может длиться с середины мая по середину августа.

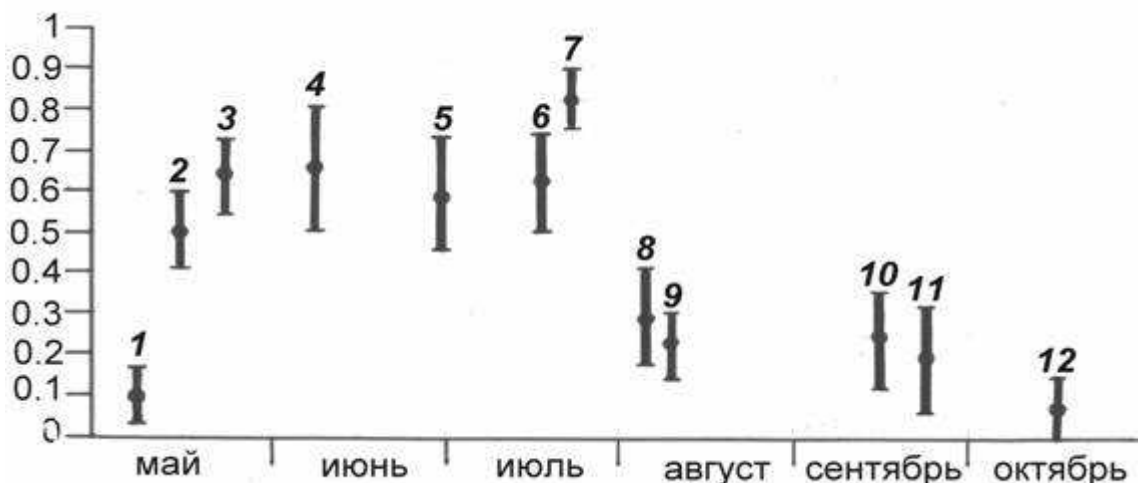


Рис.1 Распределение выборок *Unio tumidus* по частоте встречаемости аллеля *A* локуса *Gdh*. По вертикальной шкале – частота аллеля *A* локуса *Gdh*. Вертикальная линия – доверительный интервал при вероятности 0.95. Дату сбора выборок см. в табл. 1.

Для исследования механизма изменения частот был проведен эксперимент с прижизненным тестированием моллюсков. Эксперименты проводили в период смены частот аллелей. Методом биопсии у живых особей брали часть жабр для электрофоретического определения генотипа *Gdh*, после чего животных содержали в ваннах с проточной водой. Через две недели анализ повторяли. В результате у ряда особей была выявлена смена генотипа *Gdh*, в то время как у других особей генотип остался прежним. В результате опытов мы обнаружили почти все теоретически возможные варианты переходов генотипов (табл.2).

Таблица 2.

Число изменений генотипов *Gdh* жабр *Unio tumidus* в экспериментах с прижизненным тестированием

№ опыта	Варианты перехода генотипов								
	AA-AA	AA-AB	AA-BB	AB-AA	AB-AB	AB-BB	BB-AA	BB-AB	BB-BB
1	7	4	4	1	0	2	2	1	0
2	13	2	1	21	3	0	4	1	0

Сравнение распределения фенотипов до и после операции методом случайного комбинирования показало их взаимную независимость. Отсюда можно предположить, что *GDH* жабр у *U.tumidus* поочередно кодируют два независимых локуса, имеющих разную экспрессивность во времени, фенотипы которых в данных условиях электрофореза имеют одинаковую подвижность. В таком случае значительный дефицит гетерозигот, наблюдающийся при смене генного контроля, можно объяснить отрицательным эксцессом, возникающим при смешивании двух равновесных распределений. По-видимому, циклическая смена генного контроля *GDH* в популяции связана с сезонными изменениями условий обитания (температурой, содержанием кислорода в воде и т.д.). Остается неясным, что же является сигналом к началу смены генного контроля. Если предположить, что контролирующим фактором является температура воды в водоеме, то в разных точках ареала смена локусов будет происходить в разное время, что затрудняет использование этих локусов в качестве маркеров при исследовании внутривидовой структуры моллюсков. Поэтому при рассмотрении распределения частот генов *Adh* и *Gdh* по ареалу мы взяли только выборки моллюсков, полученные в период стабилизации частот аллелей *GDH* жабр – в июне и июле. В таблице 3 приводится распределение по выборкам частот аллеля *A* исследованных локусов. Все выборки были получены с июня по начало августа, то есть в период стабильности частот локуса *Gdh*. Выборки в таблице расположены с запада на восток.

Таблица 3.

Пространственное распределение частот аллелей исследованных локусов.					
№ выб.	место сбора	Алкогольдегидрогеназа		глюкозодегидрогеназа	
		N	P	N	P
1	р. Стрева	22	0.227	32	0.688
2	оз. Рытое	23	0.217	88	0.494*
3	р. Рожая	23	0	26	0.654
4	р. Лопасня	54	0	54	0.620
5	р. Ока	111	0	111	0.608
6	р. Днепр, г. Киев	46	0	65	0.438
7	р. Днепр, г. Запорожье	46	0	81	1.000
8	р. Уж	42	0	42	0.476
9	р. Ахтуба	20	0	20	0.275

*- распределение генотипов в выборке не соответствует закону Харди – Вайнберга

Для более ясного понимания материала на рис. 2 для каждой выборки представлены частоты аллелей обоих локусов при доверительных интервалах с вероятностью 0.95.

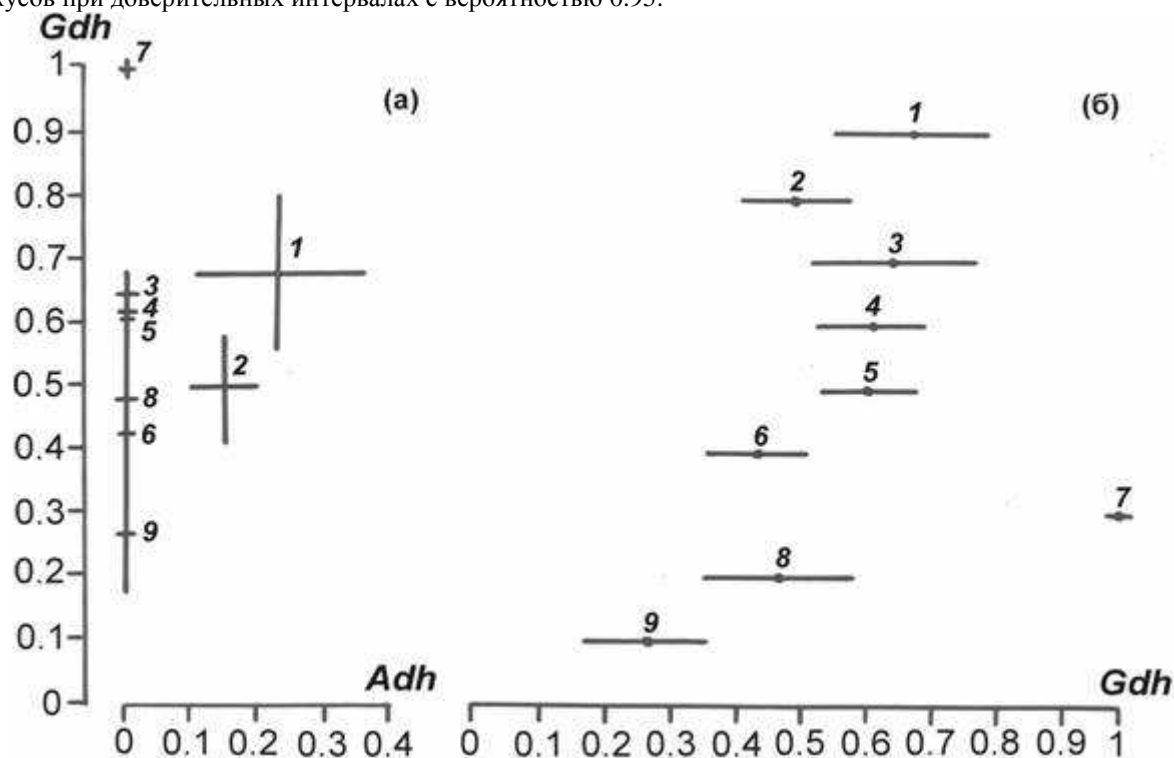


Рис.2. Распределение выборок *Unio tumidus* по частоте встречаемости аллеля А исследованных локусов (при доверительном интервале $P < 0.05$). а: по вертикальной шкале – частота аллеля А локуса *Gdh*, по горизонтальной шкале – локуса *Adh*. ; б: по горизонтальной шкале – частота аллеля А локуса *Gdh*, места сбора выборок (см. табл. 3).

Как видно из приведенного материала, все выборки по частоте аллеля А локуса *Adh* образуют две группы. В первую группу вошли выборки из реки Стрева и озера Рытого. Эти выборки полиморфны по данному локусу, и в них отмечено наличие двух аллелей. Во вторую группу вошли все остальные выборки. По данному локусу они мономорфны и аллель А в них отсутствует. Различия между выборками I и II групп по частоте встречаемости аллеля А локуса *Adh* настолько велики, что даже доверительные интервалы частот не перекрываются. Если рассматривать географическое положение выборок, то можно заметить, что выборки I группы занимают северо-западный край исследованного ареала.

Распределение аллеля А локуса *Gdh* выявляет генетическую неоднородность выборок внутри каждой группы (рис.2б). Так, выборки I группы (№ 1 и 2) достоверно, без перекрывания доверительных интервалов различаются между собой. Точно так же различаются между собой и выборки II группы, например №5 и № 6. При этом различия не зависят от географического положения выборок. Так, например, две выборки из реки Днепр (№ 6 и 7) различаются между собой с невысокой степенью достоверности, в то время как одна из них (№6) не отличается от выборки из озера Рытого Смоленской области (№2).

Таким образом, электрофоретическое исследование показало генетическую неоднородность *U.tumidus* по локусу *Gdh*, не связанную с географическим положением выборок. В то же время по локусу *Adh* локальности образуют пространственные группы, различающиеся между собой степенью полиморфизма локуса. Привлечение дополнительных локусов может, безусловно, помочь в выявлении популяционной структуры этого вида.

Однако сам факт генетического разнообразия *U.tumidus* следует учитывать при работах, связанных с охраной биотопов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. McKenzie J.A. An ecological study of the alcoholdehydrogenase (*Adh*) polymorphism of *Drosophila melanogaster* // Austral. Zool.- 1980. – V.28. – № 5-6. – P.709-716.
2. Голубцов А.С. Внутрипопуляционная изменчивость животных и белковый полиморфизм. – М.: МИР, 1988. – 168с.
3. Hilbish I.T. Demographic and temporal structure of an allele frequency cline in the mussel *Mytilus edulis* // Mar. biol. – 1985. – V.86. – № 2 – P. 163-171.
4. Жуковская Е.А., Кодолова О.П. О временной динамике генетической изменчивости черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Изв. РАН. Сер. биол. – 1997. – № 3. – С. 295-302.

Матеріал надійшов до редакції 12.06.01.

Правдухина О.Ю., Кодолова О.П. О генетическом разнообразии пресноводного моллюска *Unio tumidus* Phil (Bivalvia, Unionidae).

*Методом электрофореза в полиакриламидном геле исследовано распределение частот аллелей полиморфных локусов алкогольдегидрогеназы и глюкозодегидрогеназы в 21 выборке *Unio tumidus* из районов Литвы, Украины, России. Показана временная и пространственная генетическая изменчивость этого вида.*

Pravdukhina O.Ju., Kodolova O.P. On genetical variety of freshwater molluscs *Unio tumidus* Phil (Bivalvia, Unionidae).

*The distribution of allele frequencies of polymorphics loci alcoholdehydrogenase and glucosedehydrogenase was investigated by means of electrophoresis in polyacrilamide gel with 21 samples *Unio tumidus* from Lithuania, Ukraine, Russia. Temporal and spatial genetical variability of this species is determined.*